第5卷 第2期
1984年 5月

动 物 学 研 究
ZOOLOGICAL RESEARCH

Vol. 5, No. 2
May, 1984

蓖麻蚕五龄幼虫整体及几个主要器官DNA和RNA含量的变化

张汉云 胡 钧 杨连玺 叶文娟 黄生民
(中国科学院昆明动物研究所)

侯能俊 张丽姝
(中国科学院上海昆虫研究所)

朱洗教授从国外引进蓖麻蚕，为我国蚕业生产做出了巨大贡献。为了更好的发展蓖麻蚕丝的生产，目前对改善蓖麻蚕经济性状的研究，逐渐引起人们的重视。我们(1981)曾将家蚕 DNA 注射给五龄蓖麻蚕，引起了蓖麻蚕某些遗传性状发生了变异。为了探索外源 DNA 诱导变异的适宜条件，有必要对这一发育时期的核酸代谢情况进行研究。Tashiro等(1968)和Shigematsu等(1978)对家蚕核酸进行研究。辜祥荣等(1981)对蓖麻蚕后部丝腺核酸含量变化进行过研究。本文研究了五龄蓖麻蚕整体和几个主要器官DNA和RNA含量的变化，同时也研究了^{3}H-胸腺嘧啶及^{3}H-尿嘧啶在不同时间对不同组织DNA和RNA的参入，现将结果报告如下。

材 料 和 方 法

蓖麻蚕(Attacus Cynthia ricini)白血系统姬蚕品系。在25°C左右以蓖麻叶饲养。从大眠脱皮起每隔24小时，取一组蚕进行解剖取材。每组2—4头蚕，雌雄各半。解剖后，取出丝腺、肠、脂肪体及表皮，用冷0.9%氯化钠洗去体液，于-20°C保存备用。

同位素标记化合物 5-^{3}H-胸腺嘧啶和5-^{3}H-尿嘧啶放射比强度均为23.6居里/毫克分子。由中国科学院上海原子核研究所生产。用前以生理盐水稀释，每头蚕注射0.03毫升，含同位素放射性总强度为10微居里于血液中。一组于大眠脱皮后立即注射，以后每隔24小时取材进行测定，直至上簇。另一组于五龄第三天注射，每隔24小时取材，直至上簇。

核酸的提取和测定 按Chinzei和Tojo(1972)方法。整体蚕或组织加15倍体积冷的0.3N高氯酸匀浆，匀浆液在4°C条件下4000转/分离心，弃去上清液。这样酸抽提重复

本文1982年4月29日收到，1983年6月13日收到修改稿，

两次。接着以15倍体积80%乙醇提取，后又以同体积乙醇一乙醚（3 ：1）提取二次，再以乙醚提取一次。这样获得之沉淀悬浮于少量蒸馏水中，在搅拌条件下对50°C 0.01*M* Tris-HCl缓冲液（pH7.0）透析，以除去样品中所含的尿酸。透析后，悬液转入试管，加高氯酸至最后浓度为0.5*N*，在70°C水浴中提取20分钟。上清液离心分离，沉淀再重复提取两次，三次提取液合并，供测定核酸用。

以Burton(1956)二苯胺方法测定DNA，以小牛胸腺DNA作对照。另一份提取液于751型分光光度计260nm波长处测O.D.值，用以下公式计算RNA含量(Chinzei 和 Tojo 1972)。

$$RNA\ (微克/毫升) = 40 \times A_{260} - 0.8DNA$$

其中DNA以微克/毫升表示，A_{260}为260nm波长处的O.D值（比色杯1厘米）。

放射性同位素测定　上述乙醚提取过的沉淀，每50毫克乾沉淀加0.1毫升高氯酸，0.2毫升过氧化氢（含量不少于29%），在沸水浴中消化二小时，以0.6%2.5-二苯基噁唑二甲苯液一乙二醇甲醚（6 ：4）为闪烁液，进行测定。

结 果 与 讨 论

1.整体核酸含量的变化　从图1可见，整体总DNA和总RNA从四龄脱皮到五龄第四天逐步上升。总DNA从每头蚕含445.5微克，上升到1215微克，增长将近三倍。而这段时间里，总DNA以每头蚕含7.1毫克增至33.9毫克，增长近五倍。总RNA增长速度与同期蚕体重增长速度相当，从每头蚕体重1.22克增至6.74克。蓖麻蚕于五龄第六天都已老熟，准备上簇结茧。至五龄第五天，虽然体重尚有增加，但总DNA和总RNA均开始下降。

图2显示^{3}H-胸腺嘧啶及^{3}H-尿嘧啶分别对总DNA和总RNA的参入。结果表明，整体总DNA和总RNA均于五龄第四天达到峰值。

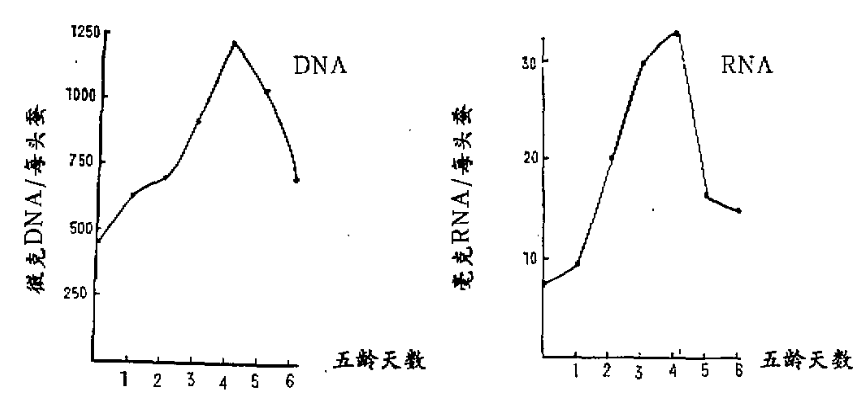


图1　五龄蓖麻蚕整体总DNA和总RNA含量的变化

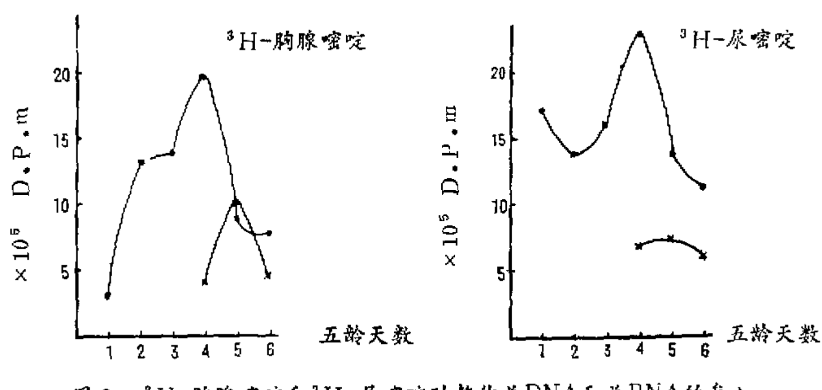


图 2　³H-胸腺嘧啶和³H-尿嘧啶对整体总DNA和总RNA的参入

•———• 四龄脱皮后注射

×———× 五龄第三天注射

2.肠组织核酸含量的变化　图3结果表明，在五龄幼虫期间肠组织总DNA和总 RNA 的增长与整体相比缓慢得多。总DNA于五龄第三天含量最高，从每头蚕肠组织含 DNA 73.5微克增至198.5微克，以后缓慢下降。总RNA 于五龄第五天达到最大值，从每头蚕肠组织含RNA 2.5毫克上升到 5.57 毫克。而在这段时间，每头蚕肠组织重量从 0.27 克增长到0.39克。

图 4 揭示³H-胸腺嘧啶及 ³H-尿嘧啶分别参入肠组织总 DNA 和总 RNA 的情况。³H-胸腺嘧啶参入高峰在五龄第三天，³H-尿嘧啶结合高峰在五龄第四天。

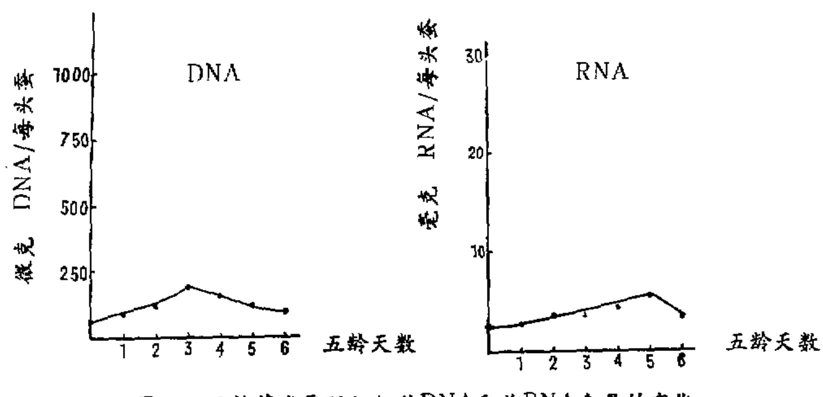


图 3　五龄蓖麻蚕肠组织总DNA和总RNA含量的变化

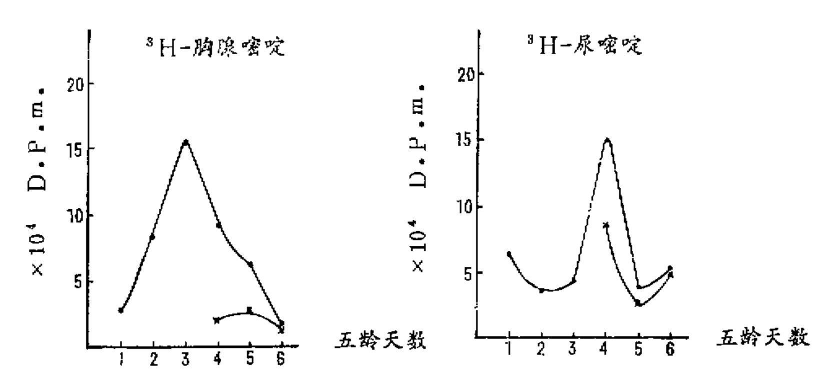


图 4 ^{3}H-胸腺嘧啶和^{3}H-尿嘧啶对肠组织总DNA和总RNA的参入

•————• 四龄脱皮后注射

×————× 五龄第三天注射

3.表皮组织核酸含量的变化 从图5可见，在五龄幼虫期，表皮组织总 DNA 和总 RNA 含量增加比较迅速，尤其是总 RNA。这反映了表皮组织在五龄期是生长旺盛的组织之一。DNA 含量五龄第四天最高，从每头蚕表皮组织含 DNA60.5 微克增至280.0微克。RNA 的含量五龄第五天最高，从2.86毫克增至 9.27 毫克。在此期间，每头蚕表皮组织重量从0.42克增至3.01克。

图6表示^{3}H-胸腺嘧啶及^{3}H-尿嘧啶对该组织总DNA和总RNA 的参入，两种同位素结合最高峰均在第四天。

4.丝腺组织核酸含量的变化 图7表示五龄蓖麻蚕丝腺组织总DNA和总RNA 含量的变化。从四龄脱皮到五龄第三天，总 DNA 含量迅速增加，达到最大值，增长了近29倍（从每头蚕丝腺含 DNA18.7微克增至559微克)。五龄第四天 DNA 含量虽有较大幅度

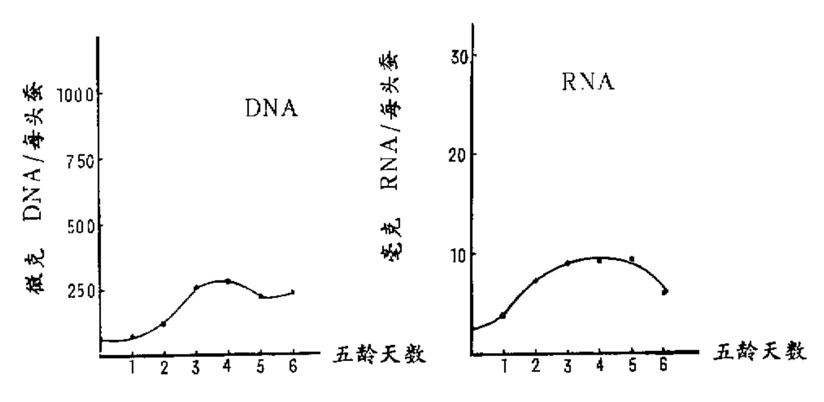


图 5 五龄蓖麻蚕表皮组织总DNA和总RNA含量的变化

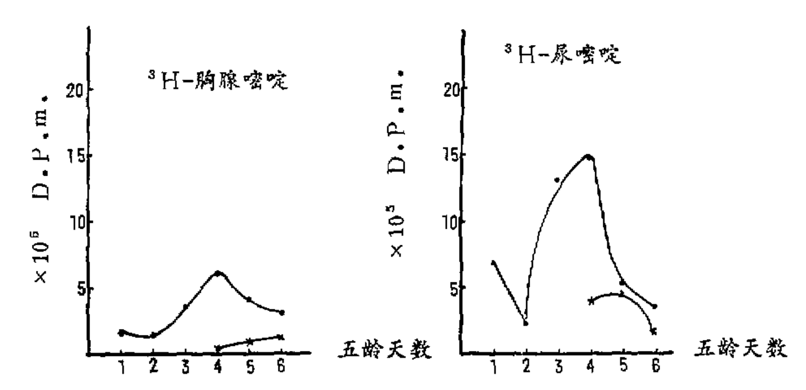


图6　^{3}H-胸腺嘧啶和^{3}H-尿嘧啶分别对表皮组织总DNA和总RNA的参入

•———• 四龄脱皮后注射

×———× 五龄第三天注射

下降，但这以后两天DNA含量维持一个较高水平。丝腺总RNA从四龄脱皮至五龄第三天，达到最高峰，增长了11倍多（从每头丝腺含RNA0.6毫克增至6.8毫克），以后一直到老熟上簇都维持较高水平。

图8揭示了^{3}H-胸腺嘧啶及^{3}H-尿嘧啶分别对丝腺组织总DNA和总RNA参入，与上述测定结果有相同的趋势。^{3}H-胸腺嘧啶参入高峰在五龄第四天，^{3}H-尿嘧啶参入高峰在五龄第五天。

5.脂肪体组织核酸含量的变化　图9表明，五龄期间脂肪体组织总DNA和总RNA含量的变化。在五龄第二天，即表皮和丝腺这两个主要组织达到高峰前，脂肪体DNA含量达到了高峰。这以后，为保证主要组织的生长，脂肪体DNA含量开始下降，直到五龄第六天，这两个主要组织DNA开始下降，脂肪体DNA含量才有一些回升。脂肪体总RNA一直缓慢地增长，到五龄第五天最高。

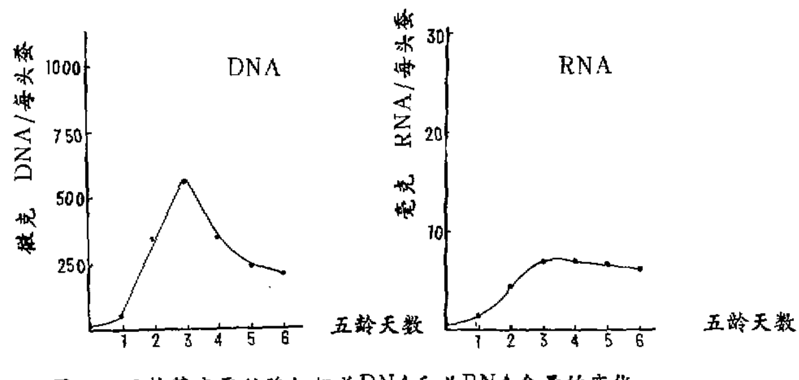


图7　五龄蓖麻蚕丝腺组织总DNA和总RNA含量的变化

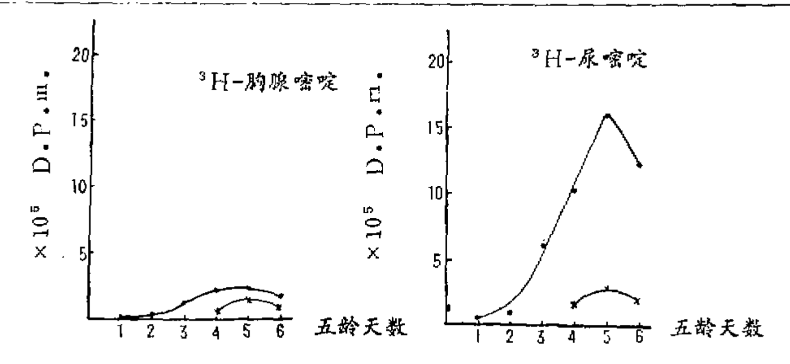


图8 ^{3}H-胸腺嘧啶和^{3}H-尿嘧啶对丝腺总DNA和总RNA的参入

•————• 四龄脱皮后注射

×————× 五龄第三天注射

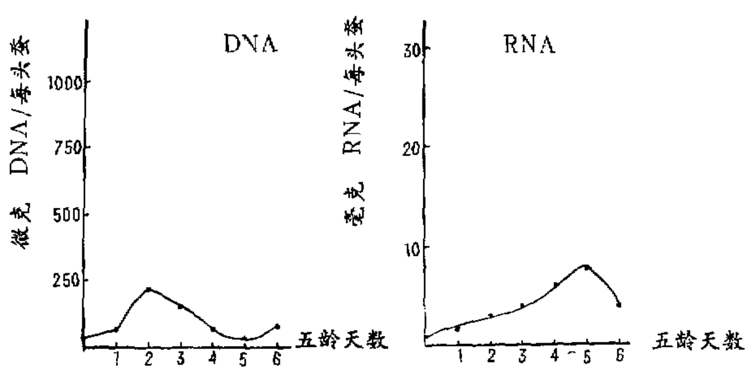


图9 五龄蓖麻蚕脂肪体总DNA和总RNA含量变化

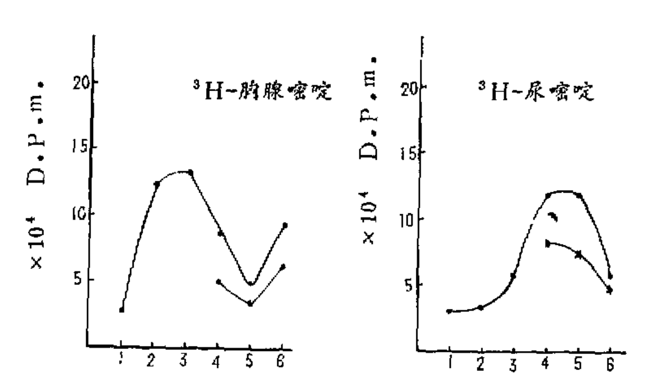


图10 ^{3}H-胸腺嘧啶和^{3}H-尿嘧啶对脂肪体总DNA和总RNA的参入

•————• 四龄脱皮后注射

×————× 五龄第三天注射

图10是^{3}H-胸腺嘧啶和^{3}H-尿嘧啶参入试验结果，与上述测定结果基本一致。

我们上述试验结果与蓖麻蚕在五龄发育期各主要组织的生长发育情况是一致的。在五龄幼虫期个体迅速增大，因而表皮组织为适应需要，生长十分迅速。为生产大量丝蛋白，为上簇营茧做好准备，在此期间丝腺组织增长速度也是很惊人的。四龄脱皮时，丝腺组织仅占体重的5%，至五龄第六天的丝腺组织占体重25%。而这两个组织总DNA和总RNA的增长速度也是增长最快，直至老熟上簇两种核酸的含量都保持一个较高水平。因而这两个组织核酸含量的变化基本反映了整体核酸含量的变化。

Chinzei和Tojo(1972)曾用甲基白蛋白硅藻土柱层析方法分离标记的DNA和RNA，证实^{3}H-尿嘧啶基本都结合进RNA，而^{3}H-胸腺嘧啶绝大部分结合进DNA。因此，我们用上述两种放射性同位素分别表示DNA和RNA的合成活性是适宜的。在试验中发现，在四龄刚脱皮就注入的放射性同位素参入进整体和各主要组织的量比较多，而五龄第三天注射的放射性同位素参入进的量较少。这可能是由于在五龄初期蚕食叶量较少，注入的放射性同位素很快参入核苷酸库，成为以后合成核酸的原料。而五龄第三日注入的放射性同位素，因这一时期蚕食叶量剧增，被从蓖麻叶来的核苷酸所稀释，因而被结合的量较少。有几个组织，在四龄刚脱皮注入^{3}H-尿嘧啶，24小时后出现了一结合高峰，也是由于这一原因所致。Chinzei和Tojo（1972）在家蚕中也发现了类似的现象。

参 考 文 献

陈元霖、郑子修、张汉云等　1981　蚕类DNA诱导遗传性变异的研究——家蚕DNA对蓖麻蚕的诱变作用. 中国科学 9：1153.

辜祥荣、曹功杰、王志红　1981　蓖麻蚕后部丝腺体核酸及丝蛋白含量的变化. 昆虫学报24（4）：349.

Burton K. 1956 A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for fhe colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 62 315—323.

Chinzei, Y. & Tojo, S. 1972 Nucleic acid changes in the whole body and several organs of the silkworm, Bombyx mori, during metemorphosis. *J. Insect Physiol.*, 18 1683—1698.

Tashiro, Y., et al. 1968 Studies on the posterior silk gland of the silkworm, Bombyx mori. l Growth of posterior silk gland cell and biosynthesis of fibroin during the fifth larval instar. *J. Cell Biol.*, 38 574—588.

Shigematsu, H., et al. 1978 Nucleic acids accumulation of silk gland of Bombyx mori in relation to silk protein. *Comp. Biochem. Physiol.* 61B 237.

CHANGES OF DNA AND RNA IN THE WHOLE BODY AND SEVERAL ORGANS OF THE ERI-SILKWORM *ATTACUS CYNTHIA RICINI* DURING THE FIFTH LARVAL INSTAR

Zhang Hanyun Hu Jun Yang Lianxi Ye Wenjuan Huang Shengmin
(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

Hou Lunjun Zhang Limei
(Shanghai Institute of Entomology, Academia Sinica)

The changes of DNA and RNA have been determined in the whole body and in several organs of the Eri-silkworm *Attacus cynthia ricini*. Both DNA and RNA increased rapidly from forth-fifth instar ecdysis to 4 or 5 days of the fifth instar, especially in integument and silkgland. The incorporation of radioactive precursors (^{3}H-thymidine and ^{3}H-uridine) into the nucleic acids of whole body and different organs has been described.